

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2002年6月27日 (27.06.2002)

PCT

(10)国際公開番号  
**WO 02/50307 A1**

(51)国際特許分類<sup>7</sup>: **C12Q 1/68, C12N 15/09,**  
G01N 33/53, 27/62, 33/566, C12M 1/00

(21)国際出願番号: PCT/JP01/10892

(22)国際出願日: 2001年12月12日 (12.12.2001)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願2000-378091  
2000年12月12日 (12.12.2000) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 猪子英俊 (INOKO, Hidetoshi) [JP/JP]; 〒243-0034 神奈川県厚木市船子1583-1-101 Kanagawa (JP). 田宮 元 (TAMIYA, Gen) [JP/JP]; 〒259-1143 神奈川県伊勢原市下糟屋

2235-2-102 Kanagawa (JP). 中島憲史 (NAKAJIMA, Kenji) [JP/JP]; 〒259-1138 神奈川県伊勢原市神戸616-3-207 Kanagawa (JP). 木村直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒266-0015 千葉県千葉市緑区小金沢町66-1-203 Chiba (JP). 永島廉平 (NAGASHIMA, Renpei) [JP/JP]. 森川 實 (MORIKAWA, Minoru) [JP/JP]; 〒104-8301 東京都中央区京橋2-1-9 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 岡本浩一 (OKAMOTO, Kouichi) [JP/JP]; 〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台1-21-3-301 Kanagawa (JP).

(74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特

[続葉有]

(54)Title: METHOD OF DETECTING POLYMORPHISM IN DNA BY USING MASS SPECTROSCOPY

(54)発明の名称: 質量分析を利用してDNAの多型を検出する方法

(57)Abstract: In detecting a genetic polymorphism by using a mass spectroscopic instrument, a genomic DNA containing the target polymorphism can be selected from a DNA sample on a substrate and bonded to the substrate by bonding an oligonucleotide hybridizable with the genomic DNA containing the target polymorphism to the substrate and then applying the genomic DNA sample to the substrate. Thus, it is found out that a target polymorphism can be more efficiently detected thereby. According to this method, polymorphisms in a large number of specimens can be quickly and comprehensively detected.

(57)要約:

質量分析器を利用した遺伝多型の検出において、目的の多型を含むゲノムDNAとハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドを基板結合させ、この基板にゲノムDNA試料を適用することにより、基板上で該DNA試料から目的の多型を含むゲノムDNAを選別すると共に基板に結合させることができ、これにより効率的に標的多型を検出し得ることを見出した。本発明の方法によれば、多くの検体の多型の検出を迅速かつ網羅的に行うことができる。

WO 02/50307 A1



許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:  
国際調査報告書

- 1 -

## 明細書

### 質量分析を利用してDNAの多型を検出する方法

#### 技術分野

本発明は、質量分析を利用してゲノム上の多型を効率的に同定するためのシステムに関する。

#### 背景技術

ゲノム解析技術の発展に伴い、現在では、ヒト全ゲノム塩基配列が決定されつつある。さらに、決定されたゲノム塩基配列情報を利用して、個々人のゲノム塩基配列の差異、即ち、遺伝多型の決定も盛んに行なわれるようになってきた。遺伝多型の決定は、疾患関連遺伝子、疾患原因遺伝子、ひいては創薬標的遺伝子の特定を可能とするため、近年、医療・診断分野における最も重要な課題の一つとなっている。

これまで遺伝多型を決定する手法としては、例えば、PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法が用いられてきた。この方法は、PCRにて増幅した産物に塩基配列特異的な制限酵素を反応させた後、電気泳動にて塩基配列の違いによる切断の有無を分子量の違いとして検出することを原理とする。しかしながら、この方法においては、多型部位を特異的に認識する制限酵素が必ずしも存在するとは限らず、また、対象とするSNPsにより用いる制限酵素が異なるため、大量のサンプルを扱うにはあまり適していないという問題点が存在する。

また、PCR-SSPC (Single-Strand Conformation Polymorphism) 法も遺伝多型の検出に利用してきた。1本鎖に変性させたDNAを非変性条件に戻すと、ヘアピンループなどの分子高次構造を形成し、この分子内構造は1塩基の変異によっても大きく影響を受け大きく変化する。この方法は、この構造の違いを非変性条件のボ

- 2 -

リアクリルアミドゲル電気泳動で移動度の違いとして検出することを原理とする。しかしながら、この方法においては、その変異のすべてを検出することは困難であり、多型の取りこぼしは避けられず、また、電気泳動時の条件により移動度が変化し、再現性のあるデータを得ることは容易ではないなどの問題点が存在する。

また、自動蛍光シークエンサーを用いた遺伝多型の解析も行なわれてきた。この方法においては、まず、多型マイクロサテライト繰り返し配列を挟んでプライマーを設定し、さらにそのプライマーに蛍光修飾を行なう。次いで、このプライマーを用いてPCRを行ない、得られた産物を自動蛍光シークエンサーにて泳動し、その鎖長を標準DNAを指標として計測することにより、繰り返し配列の多型を検出する。この方法は、近年、大量のサンプルを処理可能なシークエンサーが開発されて汎用されるに至り、マイクロサテライト多型を検出する有効な手段となっている。しかしながら、この方法では、サンプルの正確な鎖長を特定することは不可能であり、マイクロサテライト繰り返し単位が1塩基、2塩基のものでは多型判定が困難である場合があるなどの問題点が存在する。

一方、質量分析を利用した多型の検出も行なわれるようになった。これまで質量分析は、多数のサンプルが迅速に解析できない、検出されるDNAの分子量の大きさに検出限界があると考えられていたなどの理由により、多型の検出に利用されておらず、主として合成オリゴヌクレオチドの純度検定のために利用してきた。質量分析を利用した純度検定においては、検体である合成オリゴヌクレオチドをステンレス基板または同等の伝導性を保持する基板に直接マトリックス溶液と共に塗布し乾燥させた上で、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; MALDI-TOF MS) によりピークを検出していった。

最近になり、ようやく質量分析器を利用した、一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) の検出も行なわれるようになった。この方法は、検出したいゲノムフラグメントをsilicone dioxide derivatization reactionにより

- 3 -

基板に固定化した上で、Primer-Oligo Based Extentionプライマーによりポリメラーゼ連鎖反応を行い、反応物を質量分析器を用いて検出し、一塩基置換多型を決定するものである (Kai Tang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.96, p p.10016-10020, (1999))。

しかしながら、質量分析器を利用した従来の遺伝多型の検出法では、検出したい多型を有するDNA試料を調製した上で、これを直接基板に塗布させ、分子量の測定を行なうため、これら手法を利用して多くの検体の測定を行なう場合には、多大の時間と労力を必要となるという問題が存在した。

### 発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は質量分析器を利用して遺伝多型を効率的に検出し得る方法を提供することにある。本発明は、また、多量の検体の遺伝多型を迅速かつ網羅的に検出しうる方法を提供することをも目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。その結果、質量分析器を利用して遺伝多型の検出において、目的の多型を含むゲノムDNAとハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドを基板に結合させ、この基板にゲノムDNA試料を適用することにより、基板上で該DNA試料から目的の多型を含むゲノムDNAを選別すると共に基板に補足することができ、これにより効率的に標的多型を検出し得ることを見出した。

即ち、従来法においては、予め目的の多型を含むゲノムDNAを選別した上で、これを直接基板に塗布してその多型を検出していたため、多型の検出に多大な時間と労力を必要とした。一方、本発明の方法によれば、基板に目的の多型を含むゲノムDNAとハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドを結合させているため、DNA試料中に目的の多型を含むゲノムDNA以外のDNAが含まれていても、ハイブリダイゼーション反応により、基板上で目的のDNAを選別でき、それと同時に基板に該DN

- 4 -

Aを補足することができる。このため、本発明の方法においては、予め多型を含むゲノムDNAを選別して基盤に塗布する必要がなく、多型の検出を効率的に行うことことが可能である。このことは特に多くの検体の多型の検出を行う場合、例えば、数100人ー数1,000人のサンプル集団について遺伝多型のバリエーションを網羅的に決める場合やある疾患群の疾患相関解析に必要な遺伝マーク（例えば多型マイクロサテライト）を同定する場合などにおいて有効である。

本発明は、上記知見を基に完成されたものであり、質量分析を利用したDNAの多型の検出において、基板上でのハイブリダイゼーション反応を利用して目的の多型を含むDNAの選別および補足を行なう方法を提供する。

より詳しくは、本発明は、

- (1) DNAの多型を検出する方法であって、
  - (a) 被験者から多型部位とその近傍領域を含むDNA試料を調製する工程、
  - (b) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントであって標的多型を含むDNAと特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントに対し、上記DNA試料をハイブリダイズさせる工程、および
  - (c) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントにハイブリダイズされたDNAを質量分析により検出する工程、を含む方法、
- (2) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントが、検出する多型の近傍領域の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有している、(1)に記載の方法、
- (3) 工程(a)におけるDNA試料が、(i) 多型部位を挟みこむように設計されたプライマー対であって、少なくともその一方が特異的に切断することが可能な部位を含むプライマー対を利用して、被験者由来のゲノムDNAを錆型にポリメラーゼ連鎖反応を行ない、(ii) これにより得られる増幅産物を、該特異的に切断することが可能な部位で切断し、(iii) 切断後の該増幅産物に対し、任意のDNAを付加する、ことにより得られるものであり、工程(b)におけるオリゴヌクレ

オチドが、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドである、（1）に記載の方法、

（4） 特異的に切断することが可能な部位が制限酵素部位である、（3）に記載の方法、

（5） 多型がマイクロサテライトである、（1）から（4）のいずれかに記載の方法、

（6） 多型部位とその近傍領域を含むDNA試料が、同一人の複数の異なる遺伝子座の多型部位を標的として調製されており、該DNA試料を、同一の基板上に固定されたオリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、（1）から（5）のいずれかに記載の方法、

（7） 多型部位とその近傍領域を含むDNA試料が、複数人の同一の遺伝子座の多型部位を標的として調製されており、該DNA試料を、同一の基板上に固定されたオリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、（1）から（5）のいずれかに記載の方法、

（8） （3）に記載の方法に用いるための基板であって、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドが固定された基板、

（9） （6）に記載の方法に用いるための基板であって、同一人の複数の異なる遺伝子座の多型部位を標的として調製された、多型部位とその近傍領域を含むDNA試料に対し、ハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントが固定された基板、

（10） （7）に記載の方法に用いるための基板であって、複数人の同一の遺伝子座の多型部位を標的として調製された、多型部位とその近傍領域を含むDNA試料に対し、ハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントが固定された基板、

（11） オリゴヌクレオチドフラグメントが、多型の近傍領域の配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な配列を有している、（9）または（10）に

- 6 -

記載の基板、

(12) 多型がマイクロサテライトである、(8)から(11)のいずれかに記載の基板、および

(13) 基板がガラス板である、(8)から(12)のいずれかに記載の基板、を提供するものである。

本発明は、質量分析器を利用してDNAの多型を効率的に検出する方法を提供する。本発明の方法においては、まず、被験者から多型部位とその近傍領域を含むDNA試料を調製する(工程(a))。

本発明の方法において検出し得る多型としては特に制限はない。多型としては、例えば、一塩基置換多型(SNP)やマイクロサテライトなどが挙げられるが、広大なゲノム領域を標的とした相関解析においては、特にマイクロサテライトが好適である。マイクロサテライトを利用してヒトの全ゲノム領域をカバーする相関解析を行なう場合には、約3万箇所のマイクロサテライトを利用すれば目的を達成し得るが、一塩基置換多型の場合には、約数10万箇所が必要であると考えられる。従って、本発明の方法を利用して広大なゲノム領域を標的とした相関解析を行なう場合には、マイクロサテライトを標的とする方が、検出対象として必要となる多型の数の減少を図ることができると好適である。

多型部位とその近傍領域を含むDNA試料は、例えば、以下のようにして被験者から調製することができる。即ち、まず、ヒトゲノム配列からマイクロサテライト繰り返し配列をコンピューターにより検出し、その繰り返し配列を挟んで単位複製配列(amplicon)の鎖長が200bpから300bpとなるようにプライマーを設定する。次いで、このように設定したプライマーを用いて被験者のゲノムDNAを鑄型にPCRを行なうことにより、目的サイズのDNA試料を得る。

本発明において多型部位の「近傍領域」とは、ゲノムDNA上で多型部位と隣接する該多型の5'側および3'側のDNA領域を指す。質量分析器を利用して分析可能なDNA断片のサイズは、一般に200bpから300bpである。従って、本発明においてプライ

マーを設定して遺伝子増幅を行なう対象とする「多型部位の近傍領域」は、通常、多型部位から300bp以内であり、好ましくは200bp以内である。

本発明の方法においては、次いで、基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントであって、標的多型を含むDNAと特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドフラグメントに対し、上記DNA試料をハイブリダイズさせる（工程(b)）。

この工程においては、目的の多型を含むDNAが、DNA試料から選別されると同時に基板に補足される。このため目的の多型を含むDNAを予め調製して塗布していた従来法と比較して、格段に労力と時間が削減される。このことは特に多量の検体の多型を検出する場合に顕著である。例えば、複数の多型を標的とする複数のオリゴヌクレオチドがそれぞれ異なるドットとして結合された基板に対し、それぞれの多型を含むDNAの混合物からなるDNA試料を適用した場合においても、本発明によれば、基板上でそれぞれのオリゴヌクレオチドに対応するDNAが振り分けられる。従って、ハイブリダイズする位置により、該DNAがどの多型に対応するかを区別することができる。これにより多量の検体の多型を迅速かつ網羅的に検出することが可能となる。

本発明の方法において「基板」とは、オリゴヌクレオチドを固定することが可能な材料であれば特に制限されないが、好ましくは板状の材料である。オリゴヌクレオチドを結合させる基板としては、検出対象となるDNAをイオン化させるため電導性を有するものを用いる。基板としては電導性を有するものであれば特に制限はないが、例えば、電導性の板に固定したガラス板を本発明において好適に用いることができる。好ましい伝導性の板としては、例えば、ステンレス板を例示することができる。ガラス板はポリカルボジミド等によりコートされているガラス板であることが好ましい。

基板に固定するオリゴヌクレオチドは、標的多型を含むDNAと特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントであれば特に制限はない。ここで「特異的にハイブリダイズ」とは、DNA試料中の標的多型を含むDNAと

実質的にハイブリダイズし、他のDNAとは実質的にハイブリダイズしないことを意味する。オリゴヌクレオチドは、好ましくは検出する多型の近傍領域の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、検出する多型の近傍領域の塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。

基板に固定するオリゴヌクレオチドは1種類に限定する必要はなく、同定したいゲノムフラグメントの領域で相補性を有する複数種のオリゴヌクレオチドの混合物でもよい。本発明の好ましい態様において、基板に固定するオリゴヌクレオチドは、同一人からの遺伝情報を得るように設計することができる。例えば、同一人のマイクロサテライトの多型を同定できるように、多くの多型部位（例えば、10,000–30,000部位）を標的としたオリゴヌクレオチドを1枚もしくは複数枚の基板上に固定して1セットとして用いることができる。このような同一基板上の複数種のオリゴヌクレオチドに対し、被験者から調製したDNA試料を同時に適用し、ハイブリダイズさせることにより、同一人の複数の多型を迅速かつ網羅的に検出することが可能となる。従って、基板上に、例えば、複数の疾患に関する複数の多型を標的としたオリゴヌクレオチドを結合しておけば、被験者が発病するおそれのある、あるいは発病している疾患を簡便に同定することができるため、このような基板は遺伝子診断において特に有用である。

また、本発明の他の好ましい態様において、基板に同一のオリゴヌクレオチドを複数のドットとして結合させることにより、特定の多型に関する複数人のサンプル集団の遺伝情報を迅速かつ網羅的に得ることができる。このような態様は、特に、遺伝多型（例えば、マイクロサテライトやSNP）を利用して疾患相関解析を行なう上で有効である。

被験者からDNA試料を調製する際に、多型およびその近傍領域を含むDNAの末端に任意のDNAを付加した場合には、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることができる可能なオリゴヌクレオチドが固定された基板を利用して目的のDNAの多型を検

出することも可能である。この場合、DNA試料は、(I) 多型部位を挟みこむように設計されたプライマー対であって、少なくともその一方が特異的に切断することが可能な部位を含むプライマー対を利用して、被験者由来のゲノムDNAを鑄型にポリメラーゼ連鎖反応を行ない、(ii) これにより得られる増幅産物を、該特異的に切断することが可能な部位で切断し、(iii) 切断後の該増幅産物に対し、任意のDNAを付加する、ことにより得ることができる。DNA試料における特異的に切断することが可能な部位は、好ましくは制限酵素部位である。制限酵素部位としては、ゲノム上で頻度の低いもの、例えば、NotI部位などが好ましい。切断処理後の増幅産物に付加する任意のDNAとしては、特に制限はないが、例えば、polyA配列を好適に用いることができる。

基板に結合するオリゴヌクレオチドの長さは、一般的には、5塩基から200塩基であり、好ましくは10塩基から130塩基であり、さらに好ましくは15塩基から100塩基である。オリゴヌクレオチドの基板への固定は、化学的または非化学的に行なうことができる。化学的な固定の手法としてはカルボジイミド法（特開2000-146978号）を例示することができ、非科学的な固定の手法としてはポリリジン法（P. O. Brown's Lab.: <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>）を例示することができる。

基板上のオリゴヌクレオチドとDNA試料とのハイブリダイゼーション反応は、例えば、実施例記載の条件により行なうことができる。但し、ハイブリダイゼーション条件は、オリゴヌクレオチドの長さなどの諸要因により変動し得ることは当業者に周知であることを理解されたい。

本発明の方法においては、次いで、基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントにハイブリダイズされたDNAを質量分析により検出する（工程(c)）。

質量分析の方法としては、絶対分子量が得られる方法であれば特に制限はないが、例えば、MALDI-TOF MSが好ましい。MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法)) における試料は、多量のマトリックスと均一に混合された状態におかれる。マトリックスは、紫外

- 1 0 -

光である窒素レーザー光（波長=337 nm）を吸収し、熱エネルギーに変換する。この時、マトリックスのごく一部が急速に加熱され、試料と共に気化される。また、TOF MS (Time of Flight Mass Spectrometry (飛行時間型質量分析法)) は、イオンの電荷量を $z$ 、イオンの質量を $m$ とした時に質量電荷比 $m/z$ 値の違いでイオンの飛行時間が異なることを利用して質量分析を行う。MALDI-TOF MSは、GPCやLALLSなどの相対分子量を求める他の質量分析法と異なり、絶対分子量が得られるという特徴を持つ。

MALDI-TOF MSで検出するためのDNA試料は、事前処理として、非化学的結合による二重鎖を高温（例えば、90°C）処理および急冷処理を必ずしもする必要性はない。しかしながら、これらの事前処理は検体感度を高め得るために好ましい。質量分析を行なう際には、DNAがハイブリダイズした基板に対し適当なマトリックス溶液を加え、基板上のDNAを乾固する。

質量分析においては、イオン化された検体（基板上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたDNA）の分子量に応じて、その飛行時間が異なり、この異なる飛行時間が異なるピーク位置として検出される。分子量が大きいほど飛行時間は短くなり、逆に分子量が小さいほど飛行時間は長くなる。従って、検出されたピーク位置により、検体の分子量を判定することができ、これにより検体の多型（マイクロサテライトの繰り返し数や一塩基置換多型における塩基の種類）を特定することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ガラス板を用いた200 bp dsDNA(PCR産物)MALDI-TOFMS測定の結果を示す図である。

図2は、ステンレス板を基板として配列番号：1のオリゴヌクレオチドを固定したときのハイブリダイゼーションシグナルを示す図である。

図3は、ステンレス板を基板として配列番号：2のオリゴヌクレオチドを固定

- 1 1 -

したときのハイブリダイゼーションシグナルを示す図である。

図4は、ステンレス版であるサンプルスライドへのカバーガラスの固定を示す図である。

図5は、ガラス板を基板として配列番号：4または5（陰性対照）のオリゴヌクレオチドを固定したときのハイブリダイゼーションシグナルを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### [実施例1] ガラス板を用いた200bp dsDNA(PCR産物)MALDI-TOFMS測定

###### (1) PCR反応

PCRに用いた反応混合液(x1)は以下の通りである (( )内はx100の場合)。

鑄型DNA 10ng (pBluescript II SK(+) plasmid DNA)	1.0 $\mu$ l(100 $\mu$ l)
dH <sub>2</sub> O	13.4 $\mu$ l(1340.0 $\mu$ l)
10 X PCR Reaction バッファー (Applied Biosystems)	2.0 $\mu$ l(200.0 $\mu$ l)
dNTP (各2.0mM) (Applied Biosystems)	2.5 $\mu$ l(250.0 $\mu$ l)
ForwardおよびReverseプライマーMix (各20 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l(100.0 $\mu$ l)
AmpliTaqGold(Applied Biosystems)	0.1 $\mu$ l(10.0 $\mu$ l)
全量	20.0 $\mu$ l(2000.0 $\mu$ l)

PCRは、Thermalcycler Cycle PE9700(Applied Biosystems)を用いて、「95°Cで9分」の後、「96°Cで45秒、60°Cで45秒、72°Cで1分」を40サイクル、その後「7

- 1 2 -

2°Cで5分、4°Cでの終結」で実施した。

(2) MinElute PCR Purification kitによる精製

得られたPCR産物を、QIAGEN MinElute PCR Purification kitプロトコールに従って精製を行った。1本のカラムに対し300 $\mu$ lのPCR産物を通し、dH<sub>2</sub>O 10 $\mu$ lを溶出した。

(3) エタノール沈殿

上記QIAGEN精製物(6セット分(60 $\mu$ l)+dH<sub>2</sub>O 240 $\mu$ l) 300.0 $\mu$ lに、10M Ammonium acetate 46.9 $\mu$ l、100% エタノール 750.0 $\mu$ l、グリコーゲン0.5 $\mu$ lを添加し、エタノール沈殿を行った。-20°Cで20分静置し、12,000rpmで15分遠心し、得られた沈殿を70%エタノールでリーンスし、さらに12,000rpmで15分遠心し、10分乾燥を行い、最終的にdH<sub>2</sub>O 15 $\mu$ lにて溶出した。

(4) PicoGreen dsDNA Quantitation kitによる定量

PicoGreen dsDNA Quantitation kit(Molecular Probes)プロトコールに従って定量を行った。

(5) マトリックスと混合

ステンレス板(サンプルスライド)にスライドガラス(Code.#000:厚さ0.04mm)を両面テープで固定した。

また、50% アセトニトリル 1ml中に、3-Hydroxypridine-2-carboxylic acid(3-Hydroxy-2-picolinic acid): Mw.139.11 0.7Mを0.0974g、Diammonium Hydrogen citrate:Mw.226.2 0.07Mを0.010583gを溶かし、マトリックスを調製した。

マトリックスとサンプルを1:1で混合し、ガラス上へ0.5 $\mu$ lスポットした。サンプルスライドは、自然乾燥後(結晶化)、質量分析器に導入し測定した。

(6) MALDI-TOF質量分析

測定は、KRATOS KOMPACT MALDI 4(島津)を用いて行った。KOMPACT MALDI 4の測定条件を以下に示す。

- 1 3 -

---

Flight path (イオン飛行経路)	: Linear
Polarity (イオン極性)	: Negative
Mass (イオン加速電圧)	: 20kV
Profiles (1イオンサンプル当たりの測定回数)	: 50
Aim (サンプル全域照射 : 1-1000)	: 1-1000
power (レーザーパワー)	: 140-170(200bp測定時)
Accumulate	: 10
Average	: 1

---

測定の結果、200bpという高分子量のDNA分子について、顕著な高分解能を示すピークが得られた（図1）。このことは、一般的に不適と考えられていた、絶縁体であるガラス板を用いた質量分析が十分に適用可能であることを示している。それと同時に、ガラス板上でハイブリダイズさせたDNAサンプルについて、その状態のままで直接質量分析を行うことが可能であることを示唆するものである。

#### [実施例2] ステンレス板上でハイブリダイゼーションしたDNA分子の質量分析

##### (1) 核酸の固定

ステンレス板（ステンレス板；KRATOS ANALYTICAL（株）社製）を、特開2000-146978の方法に準じてカルボジイミド化した。

配列番号：1（計算値；分子量7583）及び配列番号：2（計算値；分子量7638）に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、100pmol/ $\mu$ lになるようにバッファーに溶解しDNA溶液とした。ピペットマンを用いて、カルボジイミド化ステンレス板の所定の位置に、前記DNA溶液を1 $\mu$ lスポットした。

次いで、37°Cにて30分間乾燥を行なった後、3%BSA（ウシ血清アルブミン）を含む緩衝液A（0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸（pH7.5）、0.05%トライト

- 1 4 -

ンX-100)に浸し、37°Cにて15分間乾燥した。次に、このカルボジイミド化ステンレス板をTE緩衝液(10mMトリス塩酸(pH7.2)/1mM EDTA)で洗浄後、37°Cにて15分間乾燥した。

#### (2) ハイブリダイゼーション

上記カルボジイミド化ステンレス板のDNAを固定した部分に、ハイブリダイゼーション溶液[5×SSC (SSC: 1.5M NaCl、0.15Mクエン酸ナトリウム)、10%デキストラン、配列番号: 3 (計算値; 分子量6190) のプローブ]25μlをのせ、40°Cのウォーターバスで1晩加熱した。

#### (3) ポストハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの後、カルボジイミド化ステンレス板からハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取り、ポストハイブリダイゼーション洗浄を行ない、非特異的に吸着したプローブを除去した。

ポストハイブリダイゼーション洗浄条件は、(I) 2×SSC、0.1%SDS; 室温5分間、2回、(ii) 0.2×SSC、0.1%SDS; 40°C、5分間、2回、(iii) 2×SSC; 室温、5分間、(iv) 0.3Mクエン酸アンモニウム水溶液; 室温、15秒を採用した。

#### (4) ハイブリダイゼーションの検出

得られたカルボジイミド化ステンレス板をKOMPACT MALDI2 ((株)島津製作所社製)を用いて測定した。その結果を図2及び図3に示す。

図2及び図3の結果から、本発明の核酸の検出方法によれば、プローブ核酸を(実測値; 分子量6185の位置に)非常に明瞭なシグナルとして特異的に得ることができる。一方、配列番号: 2のスポットからは、シグナルを検出できなかった。

### [実施例3] カバーガラス上でハイブリダイゼーションしたDNA分子の質量分析

#### (1) 核酸の固定(図4)

カバーガラス#000(松浪ガラス(株)社製)を、特開2000-146978の方法に準じてカルボジイミド化した。

- 1 5 -

配列番号：4（Captureオリゴマー）及び配列番号：5（陰性対照）に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、120pmol/ $\mu$ lになるようにバッファーに溶解しDNA溶液とした。ピペットマンを用いて、カルボジイミド化カバーガラスの所定の位置に、前記DNA溶液及びバッファーを0.5 $\mu$ lスポットした。

次いで、固定操作を行なった後、3%BSA（ウシ血清アルブミン）を含む緩衝液A（0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸（pH7.5）、0.05%トライトンX-100）に浸し、37°Cにて15分間乾燥した。次に、このカルボジイミド化カバーガラスをTE緩衝液（10mMトリス塩酸（pH7.2）/1mM EDTA）で洗浄後、37°Cにて15分間乾燥した。オリゴヌクレオチド無添加（DNA(-)）も対照として用いた。

#### （2）ハイブリダイゼーション

上記カルボジイミド化カバーガラスのDNAを固定した部分に、ハイブリダイゼーション溶液[5×SSC（SSC：1.5M NaCl、0.15Mクエン酸ナトリウム）、10%デキストラン、配列番号：6または配列番号：7のプローブ]10 $\mu$ lをのせ、30°Cの乾燥機で1晩加熱した。

#### （3）ポストハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの後、カルボジイミド化カバーガラスからハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取り、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行なった。

ポストハイブリダイゼーション洗浄条件は、(I) 2×SSC；室温5分間、(ii) 0.3Mクエン酸アンモニウム水溶液；室温、15秒を採用した。

#### （4）ハイブリダイゼーションの検出

得られたカルボジイミド化ガラス板を「KOMPACT MALDI4（（株）島津製作所社製）」を用いて測定した。質量分析の結果を図5に示す。相補的配列をもつ試料ではピークが観察された。このことからガラス板上でハイブリダイズさせた試料でもMALDI-TOF MSで測定可能であることが判明した。

なお、測定におけるマトリックスは、50%アセトニトリル 1ml中に、3-Hydroxy

- 1 6 -

pridine-2-carboxylic acid(3-Hydroxy-2-picolinic acid): Mw.139.11 0.7Mを0.0974g、Diammonium Hydrogen citrate:Mw.226.2 0.07Mを0.010583gを溶かし、調製した。

また、KOMPACT MALDI 4の測定条件を以下に示す。

---

Flight path (イオン飛行経路)	: Linear
Polarity (イオン極性)	: Negative
Mass (イオン加速電圧)	: 20kV
Profiles (1イオンサンプル当たりの測定回数)	: 50
Aim (サンプル全域照射 : 1-1000)	: 1-1000
Laser power (レーザーパワー)	: 150 (50mer) 、 180 (100mer)
Accumulate	: 10
Average	: 1
Store profile	: never

---

#### 産業上の利用の可能性

本発明により質量分析器を利用して遺伝多型を効率的検出し得る方法が提供され、これにより多検体の遺伝多型を迅速かつ網羅的に検出することが可能となつた。本発明の方法は、特定の病気の原因となる多型を決定するための疾患相関解析や遺伝子診断に大きく貢献しうるものである。

## 請求の範囲

1. DNAの多型を検出する方法であって、
  - (a) 被験者から多型部位とその近傍領域を含むDNA試料を調製する工程、
  - (b) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントであって標的多型を含むDNAと特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントに対し、上記DNA試料をハイブリダイズさせる工程、および
  - (c) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントにハイブリダイズされたDNAを質量分析により検出する工程、を含む方法。
2. 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントが、検出する多型の近傍領域の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有している、請求項1に記載の方法。
3. 工程(a)におけるDNA試料が、(i) 多型部位を挟みこむように設計されたプライマー対であって、少なくともその一方が特異的に切断することが可能な部位を含むプライマー対を利用して、被験者由来のゲノムDNAを鑄型にポリメラーゼ連鎖反応を行ない、(ii) これにより得られる増幅産物を、該特異的に切断することが可能な部位で切断し、(iii) 切断後の該増幅産物に対し、任意のDNAを付加する、ことにより得られるものであり、工程(b)におけるオリゴヌクレオチドが、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。
4. 特異的に切断することが可能な部位が制限酵素部位である、請求項3に記載の方法。
5. 多型がマイクロサテライトである、請求項1から4のいずれかに記載の方
6. 多型部位とその近傍領域を含むDNA試料が、同一人の複数の異なる遺伝子座の多型部位を標的として調製されており、該DNA試料を、同一の基板上に固定

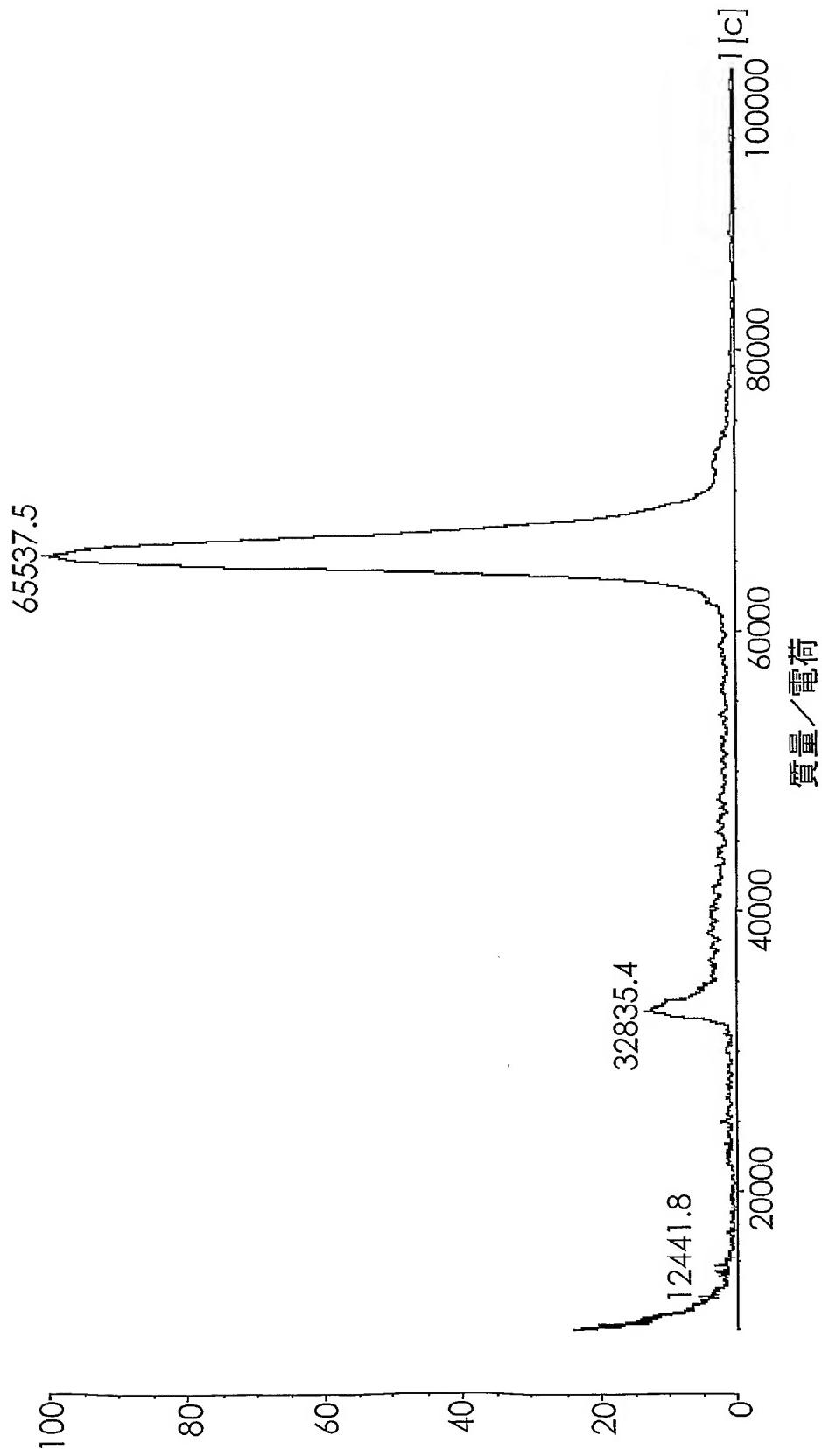
- 1 8 -

されたオリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

7. 多型部位とその近傍領域を含むDNA試料が、複数人の同一の遺伝子座の多型部位を標的として調製されており、該DNA試料を、同一の基板上に固定されたオリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。
8. 請求項 3 に記載の方法に用いるための基板であって、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドが固定された基板。
9. 請求項 6 に記載の方法に用いるための基板であって、同一人の複数の異なる遺伝子座の多型部位を標的として調製された、多型部位とその近傍領域を含むDNA試料に対し、ハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントが固定された基板。
10. 請求項 7 に記載の方法に用いるための基板であって、複数人の同一の遺伝子座の多型部位を標的として調製された、多型部位とその近傍領域を含むDNA試料に対し、ハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントが固定された基板。
11. オリゴヌクレオチドフラグメントが、多型の近傍領域の配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な配列を有している、請求項 9 または 10 に記載の基板。
12. 多型がマイクロサテライトである、請求項 8 から 11 のいずれかに記載の基板。
13. 基板がガラス板である、請求項 8 から 12 のいずれかに記載の基板。

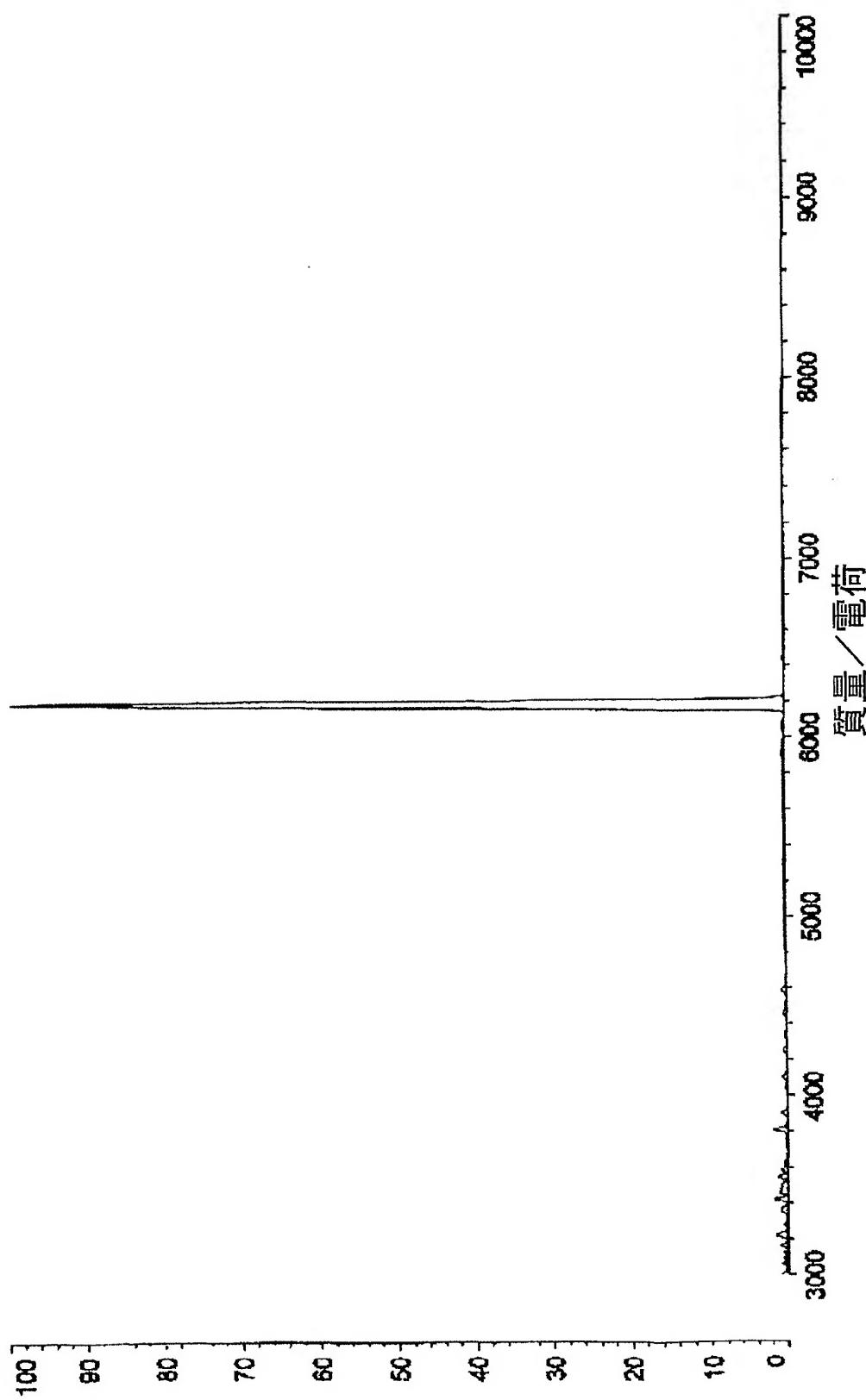
1 / 5

図 1



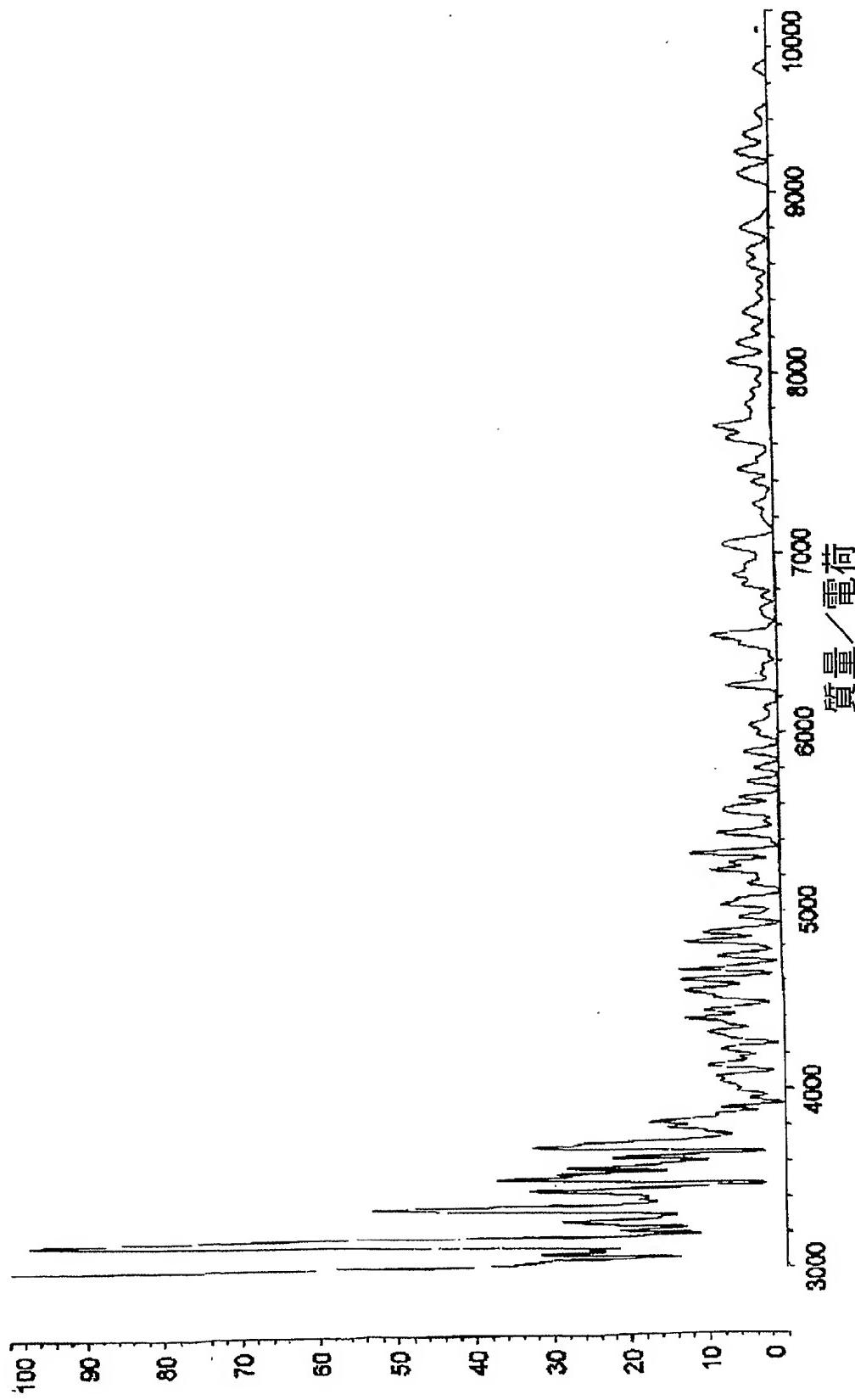
2 / 5

図 2



3 / 5

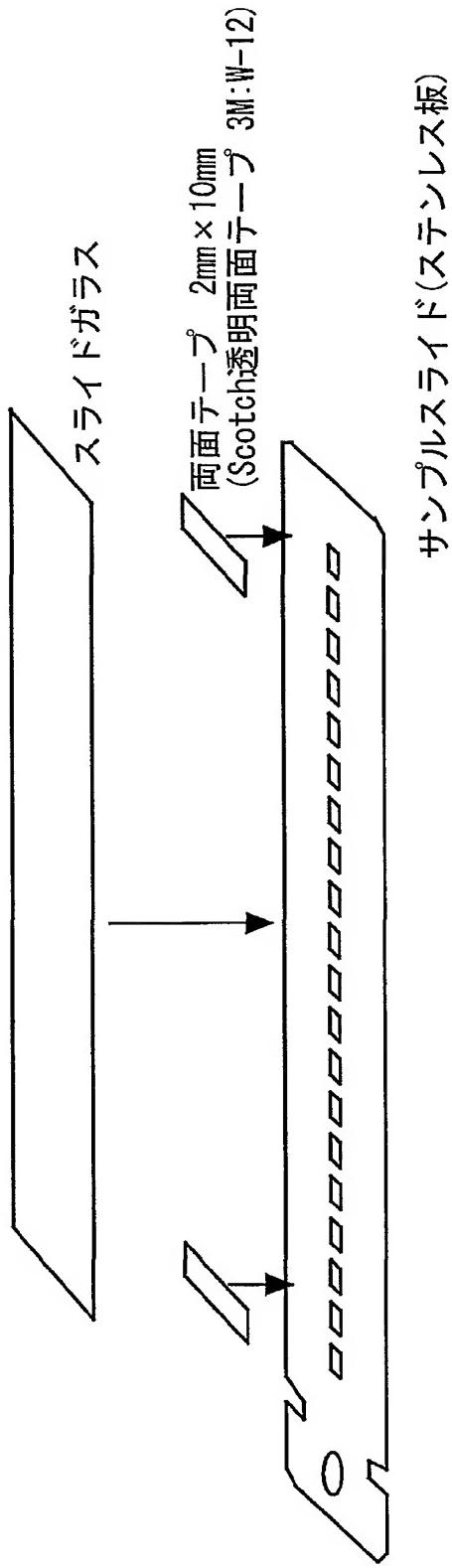
図 3



差替え用紙(規則26)

4 / 5

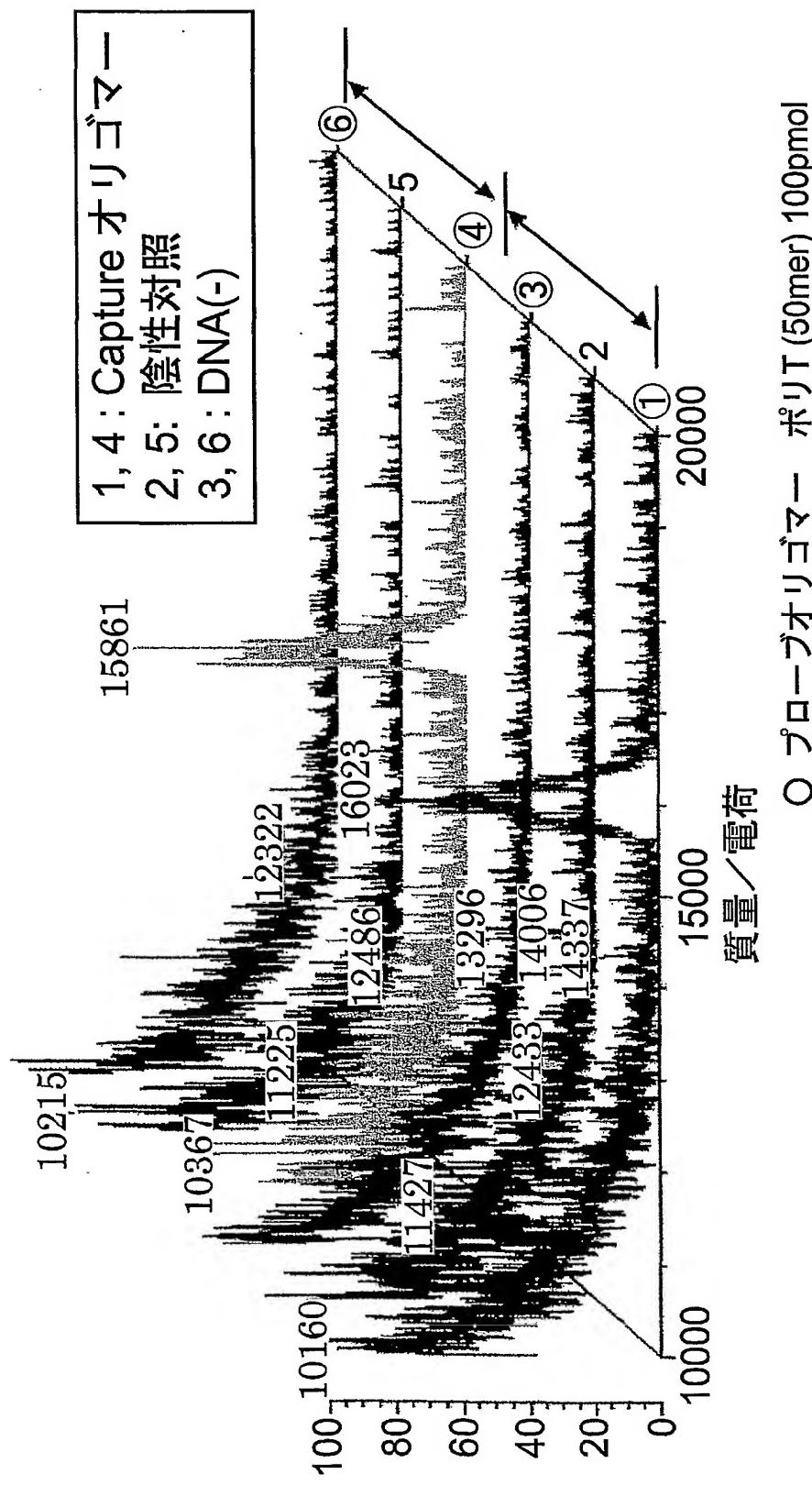
図 4



5 / 5

図 5

Kratos Kompact MALDI 4 V5.2.4  
 %Int. 100% = 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV  
 レーザーパワー - 150



1 / 5

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Method for detection of DNA polymorphisms using MALDI-TOF MS

<130> C1-A0017P

<140>

<141>

<150> JP 2000-378091

<151> 2000-12-12

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

2 / 5

<400> 1

cctagagatt cctccgtatt agttc

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

<400> 2

tccctgtgga tgtcaagaat ctttt

25

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

3 / 5

<400> 3

aataacggagg aatctctagg

20

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

<400> 4

ttttttttt aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa

40

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

4 / 5

<400> 5

tttttttttt ccttagagatt cctccgtatt agttc 35

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

<400> 6

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 50

<210> 7

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

5 / 5

<400> 7

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 100

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10892

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566, C12M1/00  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 96/29431, A (Sequenom Inc.), 26 September, 1996 (26.09.96), & JP 11-508122 A & US 5605798 A & EP 815261 A	1-13
A	EP, 1026259, A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 09 August, 2000 (09.08.00), & JP 2000-295990 A	1-13
A	Osamu NOMURA et al., Genome Kinou Kenkyu, Yodosha Co., Ltd., 10 April, 2000 (10.04.00), Pages 138 to 149	1-13
A	Kai TANG et al. "Chip-based genotyping by mass spectrometry", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, August 1999, Vol.96, No.18, Pages 10016 to 10020	1-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 March, 2002 (14.03.02)Date of mailing of the international search report  
19 March, 2002 (19.03.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/10892

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	David G. WANG et al. "Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome", SCIENCE, May 1998, Vol.280, No.5366, pages 1077 to 1082	1-13

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566  
C12M1/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566  
C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 96/29431 A (シークエンオム インコーポレーテッド) 1996.09.26 & JP 11-508122 A & US 5605798 A & EP 815261 A	1-13
A	EP 1026259 A (富士写真フィルム株式会社) 2000.08.09 & JP 2000-295990 A	1-13
A	野村 修 他 ゲノム機能研究, 羊土社, 2000.04.10 p.138-149	1-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.03.02

国際調査報告の発送日

19.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

新見 浩一

(印)

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Kai TANG et al. Chip-based genotyping by mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA August 1999, Vol. 96, No. 18, p. 10016-10020	1 - 1 3
A	David G. WANG et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. SCIENCE May 1998, Vol. 280, No. 5366, p. 1077-1082	1 - 1 3